Mémoire N° ....

Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB)

Institut du Développement Rural (IDR)

Laboratoire de Recherche et d'Enseignement
En Santé et Biotechnologie Animale (LARESBA)

Année académique 2006 -2007

Mémoire de fin d'étude :

Présenté par :

Guillaume Sylvestre SANOU

Maître es Sciences

Pour l'obtention du :

Diplôme d'Etudes Approfondies
en Biologie Appliquée et Modélisation de Systèmes Biologiques

Sur le thème :

Prévalence des *Escherichia coli* Entéropathogènes dans les diarrhées infantiles d'origine bactérienne au Centre Hospitalier Universitaire Souro SANOU de Bobo-Dioulasso

Soutenu le 10 Février 2007 devant le jury :

Président : Pr Robert T. GUIGUEMDE Centre MURAZ de Bobo-Dioulasso

Membres : Pr Georges Anicet OUEDRAOGO Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso
Pr Jean Bosco OUEDRAOGO Institut de Recherche en Sciences de la Santé
Pr Boubacar NACRO Centre Hosspitalier Universitaire Souro SANOU de Bobo-Dioulasso

Remerciements.

Ce travail a été l'œuvre de plusieurs personnes dont les contributions ont été inestimables et nous voulons remercier :

Nous remercions Monsieur le **Président du jury**, cher Professeur malgré vos multiples occupations vous nous avez fait l'honneur de présider à ce jury. Veuillez trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance

Nous remercions le **Professeur Boubacar NACRO**, chef de service de la Pédiatrie du CHU Souro SANOU Directeur de ce mémoire. L'inspiration de ce sujet ainsi que sa réalisation sont à votre honneur. Grand merci pour votre constante disponibilité et vos précieux conseils qui nous ont accompagnés durant ce travail. Cela nous a permis d'apprécier la rigueur Scientifique et la compréhension qui vous caractérisent. Pour votre soutien et incommensurable gentillesse dont nous avons bénéficié, recevez cher professeur notre très vive reconnaissance, respect et admiration. Vraiment du plus profond du cœur, Merci Professeur !

Nous remercions le **Pr Georges Anicet OUEDRAOGO** : Professeur agrégé de biochimie . Responsable du DEA de Biologie Appliquée et Modélisation de Systèmes Biologiques. Merci Professeur pour votre initiative qui contribue à la décentralisation de l'outil biologique. Vous vous êtes toujours montré favorable aux aspects qui participent à la formation des jeunes chercheurs. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Nous remercions le **Pr Jean Bosco OUEDRAOGO** : Professeur de parasitologie
Co-responsable du DEA de Biologie Appliquée et Modélisation de Systèmes Biologiques. Nous apprécions à juste titre votre qualité d'homme de Sciences. Nous vous remercions pour le précieux enseignement que nous avons reçu de vous. Recevez ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Nous remercions également tous nos enseignants de **l'Ecole Doctorale de Biologie Appliquée et Modélisation de Systèmes Biologiques**. Merci du dévouement qui fût vôtre lors de notre formation.

Nous remercions **Mr SIB Sié Edgar** Responsable des soins infirmiers au service de la Pédiatrie du CHU Souro SANOU

Nous remercions **Mr Siaka TRAORE** qui nous a appris les manipulations pratiques en Bactériologie ; **Mme Justine BASSOLET**, **Mme Salimata OUATTARA** ; **Mr Nikiensa GNOUMOU** et **Mr Georges BIEBOURE** ensemble vous avez très serviables quand besoin fût. Soyez-en remercier

Nos remerciements vont également à l'endroit du personnel du service de la Pédiatrie et du laboratoire d'analyses médicales (section bactériologie) du CHU Souro SANOU de Bobo-Dioulasso

DEDICACES

Je dédie ce travail à ma famille,
A mon père Kalo Timothée SANOU (*In Memoriam*),
A ma mère Maria SANOU qui représente tout à mes yeux les mots ne suffiraient pas pour lui exprimer ma gratitude,

A tous mes frères et sœurs,
A Ambroise l'aîné,
A Pauline et Pascal,
A Jerôme
A Jocélyne,
A Clarice et Soumaïla,

Ce travail est le fruit de votre soutien tant financier que moral. Que DIEU vous bénisse !

Résumé

Le but de cette étude prospective était de déterminer le prévalence des Escherichia coli Entéropathogènes dans les diarrhées de 52 enfants âgés d'un mois à trois ans dans le service de pédiatrie de l'hôpital Souro Sanou de Bobo-Dioulasso sur une période de 6 mois. La proportion des enfants âgés de 1 mois à 11 mois est de 49%. Les selles étaient glaireuses à 46% et liquides à 21%. Les germes à potentiel pathogène se repartissent à 75% *d'E coli*, 62.5% de *C. albicans* et 5.8% de *Salmonelles*. L'antibiogramme donne une forte résistance d'*E coli* à l'Ampicilline 90%, 80% de résistance au Cotrimoxazole.

Mots clés : Diarrhées infantiles, *Escherichia coli*, Prévalence ,CHU-SS

Liste des abréviations

EAEC : *Escherichia coli* Entéroadhérentes

EDS : Enquête Démographique et de Santé

EIEC : *Escherichia coli* Entéroinvasives

ELISA : « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay » technique d'étude immuno-enzymatique des organismes ou composés biologiques

EPEC : *Escherichia coli* Entéropathogènes

ETEC : *Escherichia coli* Entérotoxinogènes

PCR : « Polymerase Chain Réaction » dispositif enzymatique de multiplication logarithmique *in vitro* de matériel génétique.

S.R.O : sels de réhydratation orale préconisés par l'OMS pour un apport en éléments minéraux lors des diarrhées chez les enfants

UFC : Unité Formant Colonie. Terme indiquant une grandeur en microbiologie. Elle correspond aux bactéries viables dans un inoculum donnant des colonies sur boite de Pétri ou bouillons en tubes

Index des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Distribution par sexe, p. 20

Figure 2 : Répartition selon l'âge, p.20

Figure 3 : L'aspect des selles, p. 21

Figure 4 : Les germes à potentiel pathogène, p.22

Figure 5 : Taux de présence des leucocytes, p. 22

Figure 6 : La sensibilité aux antibiotiques, p.23

Tableaux

Tableau 1 : Les microorganismes responsables de diarrhées p. 11

Tableau 2 : La composition comparée de diverses solutions de réhydratation orale en apport journalier p. 14

Sommaire

Remerciements……Page 2
Dédicace……Page 3
Résumé……Page 4
Liste des Abréviations……Page 5
Index des figures……Page 6
Sommaire……Page 7
Introduction……Page 9
I Revue Bibliographique sur la diarrhée……Page 10
1. Définition……Page 10
2. L'aspect de la diarrhée……Page 10
a. La durée……Page 10
b. La consistance des selles……Page 10
3. L'étiologie de la diarrhée……Page 10
3.1 Les causes bactériennes ……Page 11
3.1.1 Le genre Escherichia……Page 11
3.1.2 Le Genre Salmonella……Page 12
3.1.3 Le genre Shigella……Page 12
3.2 les causes virales……Page 12
3.3 Les causes parasitaires……Page 12
3.4 Les causes alimentaires ou physiologiques ……Page 12
4. Les outils de diagnostic……Page 13
4.1 La coproculture standard……Page 13
4.2 La coprologie ou recherche de parasites……Page 13
4.3 Les techniques immunologiques et immunoenzymatiques……Page 13
4.3.1 Les techniques d'agglutination directe ou indirecte……Page 13
4.3.2 ELISA……Page 14
4.4 La cytométrie de flux……Page 14
4.5 les techniques de biologie moléculaire……Page 14
4.5.1 La PCR……Page 14
4.5.2 Les sondes moléculaires……Page 14
5. Traitement……Page 14
a. Réhydratation……Page 14
b. Antibiothérapie……Page 15
II. Objectifs ……Page 16
a. Objectif global……Page 16
b. Objectifs spécifiques……Page 16
III. Matériels et Méthode……Page 16
1. Matériels……Page 16
a. Equipement……Page 16
b. Milieux de culture……Page 16
c. Autres Réactifs et matériels……Page 17
2. Méthode……Page 18
a. Période, lieu et type d'étude……Page 18
b. Critères d'inclusion……Page 18
c. La collecte des échantillons……Page 18
d. L'acheminement des prélèvements……Page 18
3. Les manipulations……Page 19
a. La coproculture……Page 19
b. La conservation des souches……Page 20

c. La détermination antigénique..Page 20
IV. Résultats...Page 20
a. La distribution par sexe...Page 21
b. L'âge...Page 21
c. L'aspect des selles...Page 21
d. Les germes à potentiel pathogène..Page 22
e. Les leucocytes...Page 23
f. L'antibiogramme..Page 23
V. Commentaires ....Page 24
VI. Conclusion..Page 25
Référence bibliographique...Page 26

Introduction.

Les gastro-entérites sont des pathologies courantes et très fréquentes du tube digestif, accompagnées de douleurs et de modifications de la consistance et de la fréquence des selles. Dans nos contrées, il est important de se pencher sur les aspects d'ordre épidémiologiques de ces maladies afin de contrôler leur impact. Les gastro-entérites se manifestent par des selles diarrhéiques, liquides (cholériformes) ou glaireuses (dysentériformes). Les principales causes sont des infections aussi bien virales, que bactériennes ou parasitaires (*17*).

Bien que toutes les tranches d'âge soient concernées, les enfants en paient un lourd tribut surtout entre 0 à 3 ans. La mortalité chez les enfants de 0 à 5 ans dans le monde selon le Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF), était de 4,6 millions en 1979 et de 1,3 millions en 2002 par an (*24*). Une étude réalisée au Centre Hospitalier Universitaire - Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou en 1995 donne les chiffres de 21.4% de motif d'hospitalisation pour diarrhée avec 6,8 épisodes par an (*20*). A l'échelle nationale, 21% des enfants de moins de 5 ans ont souffert de la diarrhée en 2003 selon l'Enquête Démographique et de Santé de 2003 (*12*).

Les diarrhées constituent une préoccupation majeure de santé publique de part le monde notamment dans les pays en développement où elles viennent en deuxième position après les infections respiratoires (*24*). Au Burkina Faso ces pathologies sont aussi rencontrées dans les services sanitaires. Dans le cadre de la soutenance de mémoire de fin d'étude, nous avons choisi de prospecter le sujet afin de réunir des données relatives aux diarrhées provoquées par les bactéries pathogènes à tropisme intestinal. Les *Escherichia coli* pathogènes sont les germes que nous ciblons en particulier. Nos investigations se sont déroulées au sein de l'hôpital de référence de la ville de Bobo qui a été choisi compte tenu du regroupement en son sein des services de consultation médicale, d'hospitalisation des malades et d'un laboratoire opérationnel d'analyses médicales. Nous pensons qu'une observation de ce microcosme pourrait donner une certaine vision de la situation des diarrhées.

La prise en charge adaptée des pathologies en milieu hospitalier est parfois subordonnée à un diagnostic rapide et précis. L'interrogatoire lors de la consultation médicale permet de connaître les manifestations cliniques et oriente le clinicien (*10, 18*). Les examens complémentaires adressés au laboratoire ont pour but soit de confirmer le diagnostic soit de guider le médecin vers le mal de son patient. Ainsi le biologiste et le clinicien doivent être en parfait accord et parler un même langage. Le rôle du laboratoire est d'aider à fournir des réponses aux questions que le clinicien se pose au sujet du mal de son patient. Le diagnostic de laboratoire part des informations cliniques.

I. Revue bibliographique sur la diarrhée.

1. Définition

Les gastro-entérites sont des manifestations pathologiques du tube digestif, accompagnées de douleurs abdominales et modifications du transit intestinal. La diarrhée est une gastro-entérite avec une modification de l'aspect des selles, le malade peut présenter ou non de la fièvre et des vomissements. Les selles deviennent moins consistantes et fréquentes. Les origines de la diarrhée sont diverses infectieuses ou non infectieuses. Les agents infectieux sont principalement les virus (Rotavirus), les parasites (Giardia, Amibes, etc.) et les bactéries (Shigelles, Salmonelles, *Escherichia coli*, Campylobacter, etc.). (17, 20, 21,23).

2. L'aspect de la diarrhée

La diarrhée se présente sous différentes formes selon les causes et selon la durée.

a. La durée.

La diarrhée peut durer entre 72 heures et 5 jours. La diarrhée qui survient brutalement avec une augmentation du nombre des selles (plus de 3 par jour) et une modification de la consistance des selles est dite « diarrhée aiguë ». Lorsque les manifestations dépassent une semaine, la diarrhée est dite « persistante » et au-delà de 14 jours c'est une « diarrhée chronique » selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

b. La consistance des selles.

Selon l'aspect des selles il est décrit deux types de diarrhées :

- La diarrhée hydrique liquidienne cholériforme (choléra).
- La diarrhée dysentériforme avec des selles glaireuses ou glairo-sanguinolentes se rapprochant d'une shigellose.

La suspicion de l'agent causal peut être orientée par l'aspect des selles. Il est donc important d'y accorder son attention.

3. L'étiologie de la diarrhée

Les diarrhées peuvent être d'origine infectieuse ou non infectieuse.

Les diarrhées infectieuses sont causées par les bactéries , les parasites et les virus comme l'indique le tableau ci-dessous.

Bactéries	Virus	Parasites
Salmonella sp.	Rotavirus	*Giardia lamblia*
Shigella	Calicivirus et apparentés :	*Entamoeba histolytica*
Campylobacter sp.	Norwalk virus	*Cryptosporidium parvum*
Escherichia coli entérotoxinogène (ETEC)	Norwalk like virus	*Cyclospora cayetanensis*
Escherichia coli entéropathogène (EPEC)	Petits virus ronds	*Strongyloides stercoralis*
Escherichia coli entérohémorragique (EHEC)	Adénovirus entériques	*Balantidium coli*
Escherichia coli entéro-invasif (EIEC)	Astrovirus	*Blastocystis hominis*
Yersinia sp.	Coronavirus	*Isospora belli*
Clostridium difficile	Torovirus	*Schistosoma mansoni*
Clostridium perfringens	Cytomégalovirus	
Staphylococcus aureus	Herpes simplex virus	
Bacillus cereus		
Vibrio cholerae et autres Vibrio		
Aeromonas		
Plesiomonas shigelloides		
Chlamydia		
Treponema pallidum		
Neisseria gonorrhoeae		

Extrait d'article : D. Carré .Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë.EMC-Chirurgie 1(2004) 493 – 532

Tableau 1 : Les microorganismes responsables de diarrhées

3.1 Les causes bactériennes

Le tube digestif et plus précisément les intestins,est colonisé par une flore microbienne. Cette flore commensale constitue une barrière tant physique que biochimique. Ainsi un microorganisme pathogène doit développer des aptitudes pour passer la barrière commensale et les muqueuses intestinales. Différents mécanismes sont utilisés par les organismes pathogènes .

3.1.1 Le genre *Escherichia*

Ce genre formé de plusieurs espèces dont la plus importante d'un point de vue médicale est *Escherichia coli*. Bactérie participant à la flore commensale normale, elle contient des souches pathogènes. Les pathovars responsables de diarrhées chez l'homme sont subdivisées en six catégories : Les *Escherichia coli* Entéropathogènes (EPEC) causant la « Turista », les *Escherichia coli* Entérohémorrhagiques (EHEC), les *Escherichia coli* Entérotoxinogènes (ETEC), les *Escherichia coli* Entéroinvasives (EIEC), les *Escherichia coli* Entéroaggrégatives (EAggEC), les *Escherichia coli* Entéroadhérentes (EAEC) (2,14)

3.1.2 Le genre *Salmonella*

Les *Salmonella* sont une cause fréquente de diarrhée en zone tropicale responsables des fièvres typhoïde et paratyphoïde. Leur pathogénie est du type invasif, elles traverse le tapis épithélial pour se retrouver dans la circulation sanguine ce qui explique la fièvre.

3.1.3 Le genre *Shigella*

Les *Shigella* sont responsables d'épidémies de diarrhée aiguë grave. Elles agissent principalement par la sécrétion de toxines qui provoquent une inversion de l'absorption d'eau et d'électrolytes. La conséquence étant une perte rapide et importante d'eau du corps.

3.2 Les causes virales

De nombreux virus interviennent comme agents causals de diarrhées les plus rencontrés sont les Rotavirus et les Calicivirus. (6)

3.3 Les causes parasitaires

Les parasites jouent un rôle important dans les diarrhées au niveau des populations en zones rurales les quartiers défavorisés des villes Africaines. L'insalubrité et le manque d'hygiène expliquent le maintien des affections dans ces zones.

Les parasites les plus courants sont les protozoaires. Les Amibes, les Giardia sont fréquentes (6)

3.4 Les causes alimentaires ou physiologique

La diarrhée peut aussi avoir une origine alimentaire. En effet, après un repas les aliments trop riches en protéines, en lipides ou en sucres, la digestion peut être incomplète de sorte que les macromolécules restées dans la lumière du tube digestif entraînent par osmose une sortie importante d'eau.

4. Les outils de diagnostic

4.1 La coproculture standard

Elle comprend plusieurs étapes :

- L'étude macroscopique qui renseigne sur l'aspect physique (couleur) et sur la consistance des selles (liquide, glaireuse, molle , moulée).
- L'étude microscopique qui comprend l'état frais révélant la mobilité de la flore, la présence d'hématies et de leucocytes voire de parasites. Et un frottis coloré soit au bleu de méthylène (comptage de leucocytes) soit Gram permet révéler la morphologie des germes
- La culture sur milieux pour isoler et identifier les différents germes

4.2 La coprologie ou recherche de parasites

Elle regroupe plusieurs techniques qui permettent d'optimiser la recherche des parasites dans les selles.

4.3 Les techniques immunologiques et immunoenzymatiques

Nous avons l'utilisation de la réaction antigène-anticorps spécifique pour révéler la présence d'un microorganisme ou d'une toxine donnée. Ces techniques sont rendues possible grâce à la disponibilité dans le commerce d'anticorps monoclonaux.

4.3.1 Les techniques d'agglutination directe ou indirecte

Il existe des sérum d'agglutination que l'on peut utiliser sur les selles qui indiquent la présence même du microorganisme ou du composé chimique recherché.
Il est également possible de rechercher dans le sang du patient la présence d'anticorps. C'est le principe du Sérodiagnostic de Widal-Felix en cas de suspicion de Salmonellose.

4.3.2 ELISA

L'ELISA pour « Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay » est une technique immunoenzymatique dont il existe différentes variantes adaptées au microorganisme ou toxine recherché. Le principe est basé d'une part sur la réaction antigène-anticorps et d'autre part la révélation est fait grâce au produit coloré de la réaction enzyme-substrat. (16)

4.4 La cytométrie de flux

C'est une technique qui utilise des anticorps marqués par des fluorochromes. La fluorescence qui découle de la réaction antigène-anticorps positive indique la présence et la quantité d'antigènes.

4.5 Les techniques biologie moléculaire

Ce sont des techniques ciblées essentiellement sur les acides nucléiques ADN et ARN

4.5.1 La PCR

La « Réaction de Polymérse en Chaîne » ou PCR permet l'amplification d'un gène ou d'une séquence nucléotidique donnée grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. La recherche se fait sur les selles directement. En PCR, les gènes ial pour « invasive-associated locus », ipa (A,B,C,D,H) « invasive plasmid antigen » sont utilisés comme marqueurs du caractère invasif des EIEC (15, 21,23)

4.5.2 Les sondes d'hybridation

Les sondes sont de courtes séquences d'ADN ou d'ARN qui se fixent sur des séquences complementaires sur le génome microbien. La réaction positive est soit colorée soit fluorescente.

5. Traitement.

a. Réhydratation

Le traitement des diarrhées dues à Escherichia coli est basé sur la réhydratation orale des enfants selon les recommandations de l'OMS et du Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF). Pour ce faire il est mis à la disposition des populations, des sels de réhydratation oral (SRO) car ce qui est plus urgent dans la prise en charge des enfants c'est éviter la déshydratation (22). La malnutrition est un facteur déterminant dans la survenue de la diarrhée surtout dans les pays en développement comme

le Burkina Faso. La dénutrition après un épisode favorise la réinstallation de la maladie conduisant à un cercle vicieux qu'il faut briser. (5, 6, 8, 19).

Le tableau ci-dessous indique la prise d'électrolytes journalière recommandée par l'OMS.

Composition par litre reconstitué		Soluté OMS	Adiaril®	Alhydrate®	GES 45®	Lytren®	Coca-Cola®	Jus d'orange
Sodium (Na) (mmol)		90	49	60	49	50	2	< 1
Potassium (K) (mmol)		20	25	20	25	25	0,1	50
Chlore (Cl) (mmol)		80	25	60	25	40	2	
Glucose (g)		20	20	(saccharose)	19,7	9	100	120
Anions en mmol	bicarbonates		24		23	10		
	Citrates	10		6	9	15	13	50
	Gluconates		25					
Calories		80	160	320	158	205		
Osmolalité		310				290	750	730
Osmolarité (mOsm/l)		301	326	240	298	240		

OMS : Organisation mondiale de la santé.

Extrait d'article : D. Carré .Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë.EMC-Chirurgie 1(2004) 493 – 532

Tableau 2 : La composition comparée de diverses solutions de réhydratation orale en apport journalier

b. Antibiothérapie

Le traitement des diarrhées par les agents antibactériens n'est pas prioritaire car en général la réhydratation suffit à circonscrire le mal ou elles se résorbent seules. Et surtout avec la résistance croissante des germes aux antibiotiques posant d'autres problèmes que l'on pourrait imaginer catastrophique dans l'avenir, cette démarche est à éviter sinon réserver aux cas graves. En pratique courante, le traitement par les antibiotiques en première intension vise à prévenir une bactériémie ou écourter un épisode sur un terrain d'immunodépression ou de dénutrition sévère. Les antibiotiques les plus couramment utilisés sont les fluoroquinolones (Ciprofloxacine) contre-indiqués chez les enfants, un traitement alternatif est possible grâce au Cotrimoxazole et les Céphalosporines de troisième génération (*6*)

Les antibiotiques sont classés en familles en fonction de leur structure chimique ou de leur mode d'action. Ainsi, en tenant compte de la diversité morphologique des bactéries il est prévisible que le spectre d'action d'un antibiotique est lié à sa capacité de traverser les membranes biologiques pour atteindre sa cible. Aussi, l'antibiotique peut être considéré comme bactériostatique s'il bloque la croissance bactérienne, il est dit bactéricide lorsqu'il détruit les bactéries. En santé publique, l'arsenal thérapeutique contre les bactéries pathogènes que constituent les antibiotiques, est de moins en moins efficace du fait de l'apparution progressive de résistance. Les bactéries se défendent en détruisant les molécules ou en les détournant de leur cible. Ce phénomène est soit phénotypique soit génétique c'est-à-dire lié aux gènes soutenu par les transformations ou par les mutations (1, 3, 4).

II. Objectifs.

a. Objectif global.

Déterminer la prévalence des *Escherichia coli* Entéroinvasives parmi les diarrhées infectieuses d'origine bactérienne chez les enfants âgés entre un (1) mois et trois (3) ans au Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou de Bobo.

b. Objectifs spécifiques.

- Collecter des échantillons de selles de patients malades de diarrhée qui ont consulté au service de pédiatrie.
- Décrire l'aspect physique des selles
- Réaliser une coproculture
- Sérotyper l'échantillon grâce à l'utilisation de sérums d'agglutination commercialisés à cet effet.

III. Matériel et Méthodes.

1. Matériel

Le matériel de laboratoire utilisé dans le cadre des manipulations en Bactériologie se compose comme suit :

a. Equipement

- Une étuve dont la température est fixée à 37°C ± 0.5 °C
- Un microscope à lampe électrique
- Des Pipettes Pasteurs en verre avec bouchée de coton et dont le bout est soudé.

b. Milieux de culture

Des Milieux de culture coulés dans des boites de Pétri :

- Hektoen : milieu d'isolement pour Salmonelles et Shigelles.

  Ce milieu contient le bleu de Bromothymol jouant le rôle d'indicateur de pH et la fuschine acide qui se colore en présence d'aldéhyde ; trois sucres le saccharose, la salicine et le lactose. En effet, il y'a les bactéries « lactose négatif » qui ne fermentent pas le lactose dont les colonies sont vertes ou bleu vertes (*Salmonelles, Shigelles, E. coli* Entéroinvasives) avec ou sans production d'Hydrogène sulfuré H_2S (coloration

noir à partir du sodium thiosulfate) tandis que les bactéries « lactose positif » ont une couleur jaune saumon.

- EMB : milieu sélectif pour Entérobactéries contenant 2 inhibiteurs l'éosine et le bleu de méthylène favorisant la poussée des germes à Gram négatif. *Escherichia coli* donne des colonies à reflet vert métallique ou sombres sans le reflet.
- Le Sabouraud qui permet la culture des levures dont les Candida.
- Le milieu Muller-Hinton 2 qui est un milieu « tout germes » sert à la réalisation de l'antibiogramme sur disques. Une suspension bactérienne d'une à deux colonies (environ 0.5 McFarlane) est inoculée par écouvillonnage.
- Les galeries API 20 E (Bio Mérieux) permettent l'identification biochimique des Entérobactéries en testant 20 caractères biochimiques dont l'oxydase, l'uréase, l'ONPG et la fermentation de plusieurs sucres dont le sorbitol (*E. coli* O157 : H 7 ne fermente pas le sorbitol).
- Le bouillon cœur-cervelle :bouillon d'enrichissement pour les « bactéries exigeantes »

c. Autres réactifs et matériel

- Le réactif de Kovacs.
- Le test de l'urée-indole
- Des tubes d'eau distillée
- Des flacons de medium (Muller-Hinton semi liquide) pour l'ensemencement des antibiogrammes API
- L'huile de paraffine
- Des disques d'antibiotiques
- Bouteille de butane (bec Bunsen) pour la stérilisation de la zone de manipulation
- Pinces Brussel pour la manipulation des disques d'antibiotiques
- Glycérol
- Des cryotubes

2. Méthode

a. Période, lieu et type d'étude

Il s'agit ici d'une étude descriptive et prospective dont le but est d'évaluer la prévalence des *Escherichia coli* potentiellement responsables des diarrhées chez les enfants qui ont un âge compris entre 1 mois et 3 ans.

L'étude s'est déroulée du 19 Juillet 2006 au 28 Décembre 2006 au sein du Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou de Bobo Dioulasso (CHUSS). C'est un Hôpital de référence qui est le deuxième plus grand hôpital du Burkina Faso après le CHU-Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou. Il regroupe différents services dont une Pédiatrie et un laboratoire de référence pour les analyses médicales. La Pédiatrie est organisée de sorte que les enfants âgés de moins de 3 ans sont hospitalisés à l'étage et ceux de plus de 3 ans jusqu'à 15 ans sont hospitalisés au rez-de-chaussée. La capacité est de 115 lits et berceaux environ et annuellement le nombre des enfants hospitalisés varie de 4000 à 6000 selon les années.

b. Critères d'inclusion

Nous avons inclus les patients dans l'étude sur le critère de l'âge. Les enfants, filles et garçons, âgés d'un (1) mois à trois (3) ans et présentant des signes de diarrhée. Le caractère « aiguë » ou « persistante » de la diarrhée n'a pas été pris en compte.

c. La collecte des échantillons.

Les échantillons seront constitués à partir des prélèvements reçus au laboratoire pour analyses bactériologiques (patients du service de pédiatrie). Les patients concernés sont les enfants filles et garçons qui ont reçus une consultation dans le service de Pédiatrie de l'Hôpital. Les prélèvements sont faits dans un pot stérile pour l'examen de coproculture.

d. L'acheminement des prélèvements

Les prélèvements des patients hospitalisés parviennent au laboratoire immédiatement. Pour les malades externes il est plus difficile de contrôler les délais d'acheminement. Dès la réception au laboratoire, les prélèvements sont traités (étiquetage, ensemencement et observation au microscope).

3. Les manipulations

a. La coproculture

L'examen comporte des étapes successives.

- L'observation macroscopique : elle permet de classer les selles selon l'aspect (liquides, moulées, molles, glaireuses ou glairo-sanglantes).
- L'état frais qui indique la présence d'hématies, de parasites et permet d'apprécier la mobilité de la flore bactérienne (Objectifs X10 et X40) ; le frottis coloré au bleu de méthylène pour déterminer la présence de leucocytes dans les selles (Objectif X100).
- L'ensemencement sur les milieux Hektoen pour l'isolement des Shigelles, Salmonelles et *E. coli* lactose négatif (EIEC). L'EMB est ensemencé pour la détection des colonies aux caractères culturaux d'*E. coli* (reflet vert métallique, colonies sombres). Le Sabouraud pour les levures (Candida). Nous ensemençons par la méthode des stries avec une pipette Pasteur dans des conditions d'asepsie (flamme de bec Bunsen).
- L'incubation des boîtes de Pétri se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
- La lecture tient compte des morphologies des colonies. Seules celles ressemblant à *Escherichia coli* sont considérées. Deux colonies sont prélevées pour servir à l'identification biochimique. Le test de l'urée-indole est fait sachant que 99.99% des souches d'*Escherichia coli* sont positifs tandis que les Salmonelles et les Shigelles sont négatifs.
- L'identification est faite grâce aux galeries API 20 E (Bio Mérieux). Une colonie bien isolée est effleurée avec le bout de la pipette en verre afin de prélever une petite quantité de bactéries pour faire une suspension de concentration équivalente à 0.5 MacFarlane dans un tube contenant de l'eau distillée stérile un inoculum est aspiré et versé dans les cupules de la galerie conformément aux recommandations du manuel d'utilisation fourni par le fabriquant. l'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures à l'étuve. La lecture se fait selon le manuel en attribuant une valeur numérique correspondant au numéro du germe dans le catalogue de lecture.
- L'antibiogramme qui a un but indicatif est réalisé par la méthode des disques d'antibiotiques sur Muller-Hinton 2. Une suspension bactérienne est ensemencée par écouvillonnage sur la boite de Pétri et 6 à 7 disques d'antibiotiques sont déposés respectant une distance d'un centimètre et demi entre elles. La lecture tient compte du diamètre d'inhibition pour qualifier la souche de résistante, sensible ou intermédiaire à l'agent bactérien testé mais nous classerons les « intermédiaires » parmi les « résistants » (7). Les antibiotiques testés dans 10 isolats sont : l'ampicilline (AM), l'Augmentin (AMC), la Gentamicine (GEN), le Cotrimoxazole (STX), le

Chloramphénicol (C). L'antibiogramme peut aussi se faire grâce aux galeries API (Biomérieux). Les boites et galeries sont incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures.

b. La conservation des souches

Le groupage ou typage est possible sur les souches pures pour déterminer les structures antigéniques (O, H, K). Cette opération en routine peut être faite immédiatement quand le temps le permet sinon, une conservation des souches pour des études complémentaires ultérieures est entamée.

La conservation des souches suit des étapes :

- L'étiquetage précis des échantillons ;
- Le conditionnement minutieux ;
    - Cryotubes.
    - Milieux de conservation : milieu cœur-cervelle .
    - Glycérol (15%).
    - Conditionnement des souches dans les cryotubes (1ml de milieu + 3 gouttes de Glycérol + 1 colonie bactérienne).
    - Congélation à – 70°C .

Il faut rappeler que des conditions d'asepsie (flamme de bec Bunsen) sont recommandées pour garantir la non contamination pendant la manipulation.

c. La détermination antigénique et l'antibiogramme.

Les sérotypes et sérogroupes sont déterminés grâce à l'agglutination par sérum. Il existe sur le marché des kits de sérums agglutinant pour les grands groupes d'*Escherichia coli* notamment ceux pathogènes pour l'homme. Dans la routine quotidienne, nos laboratoires locaux ne pratiquent pas l'identification antigénique des germes entériques après la culture. Ainsi les importateurs de produits biomédicaux ne les importent que sur commande.

III. Résultats.

Au cours de la collecte de nos informations, de juillet 2006 à Décembre 2006, nous avons rencontré 52 cas d'enfants de moins de 5 ans ayant présenté des symptômes diarrhéiques pour lesquels certains ont été hospitalisés.

a. La distribution par sexe.

Les garçons représentaient 53.85% et les filles 36.54% des patients. La proportion des « non indiqué » correspond aux bulletins sans mention du sexe. La figure 1 indique la distribution des enfants par sexe.

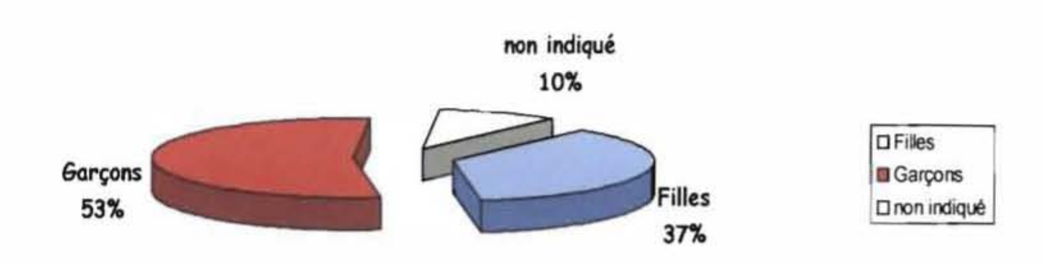


Figure 1 : Distribution par sexe.

b. L'âge.

L'âge des patients varie de 1 mois à 3 ans et demi avec les enfants de 1-11 mois (49 %), de 12-23 mois (33 %), de 24-35 mois (16 %) et de 36 mois et plus (2%) comme le montre la figure 2.

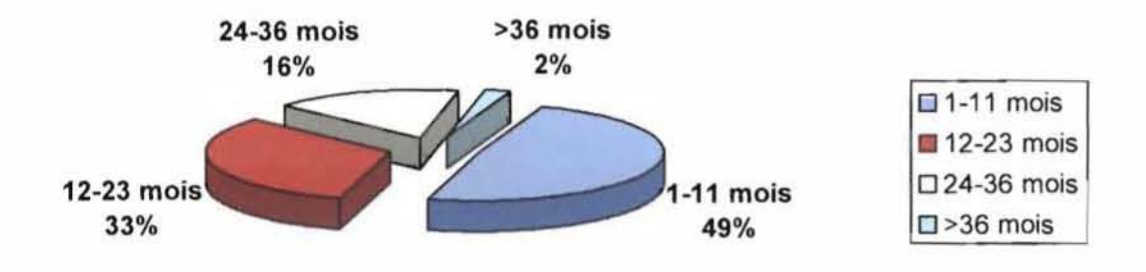


Figure 2 : Répartition selon l'âge (mois)

c. L'aspect des selles.

Les selles présentaient des aspects variés molles 31 %, grumelées 2%, glaireuses 46 % et liquides à 21 %.

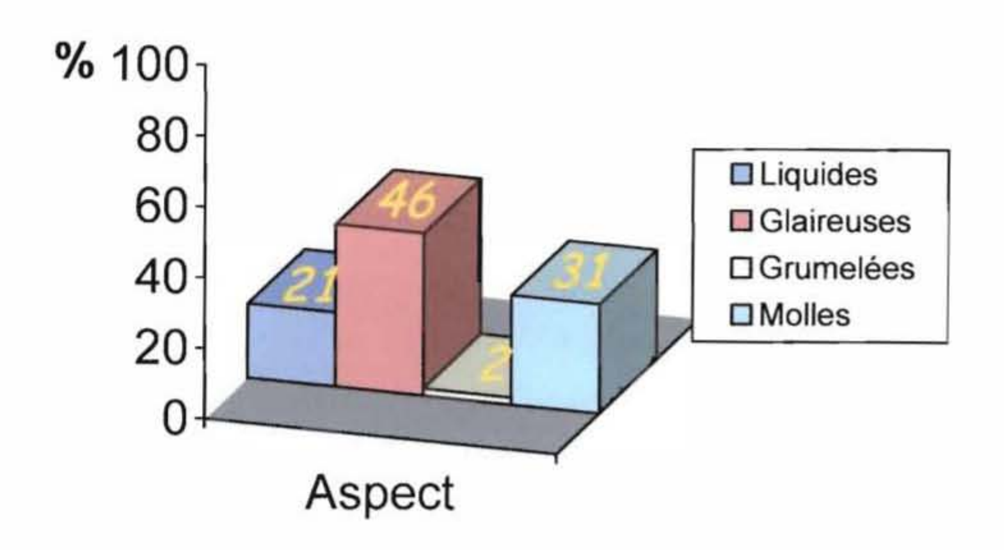


Figure 3 : Aspect des selles.

d. Les bactéries à potentiel pathogènes.

Les germes rencontrés qui sont susceptibles d'être la cause de la diarrhée des sujets malades ont été *Escherichia coli* en 39 cas (75%), *Salmonelles* dans 3 cas (5.8 %), et *Candida albicans dans 20 cas(38.5* %), nous avons rencontré un cas de kyste de *Giardia* résultats que nous avons consignés dans la figure 4.

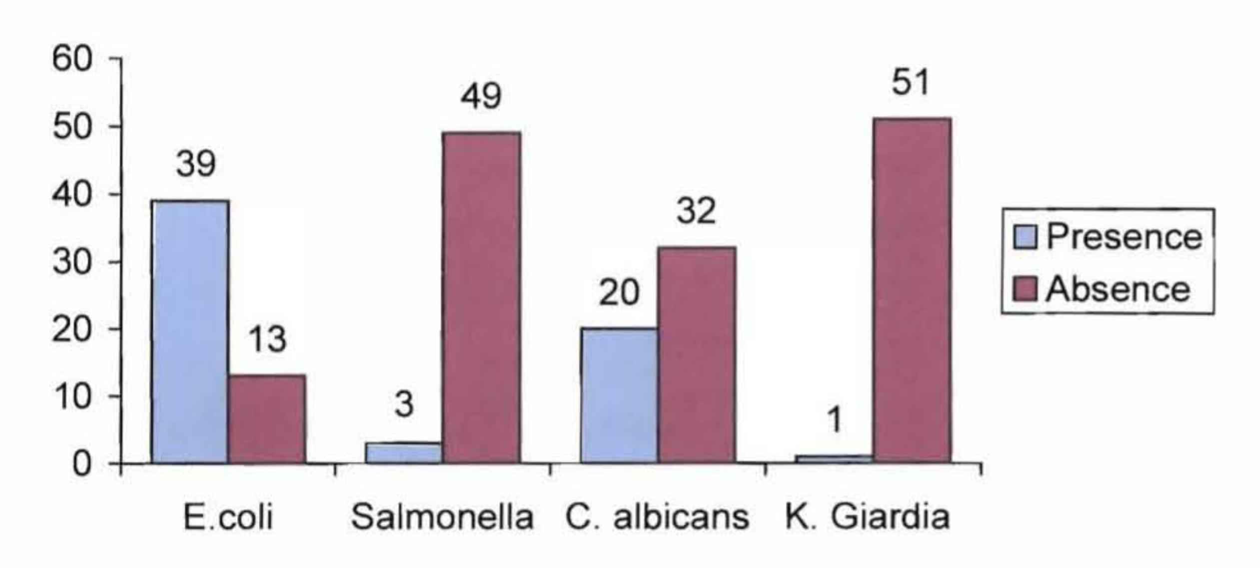


Figure 4 : Les germes à potentiel pathogène.

e. Les leucocytes.

Les leucocytes étaient présents dans environ (15) 29 % des cas comme le présente la figure 5. Les leucocytes témoignent d'une inflammation de la muqueuse intestinale.

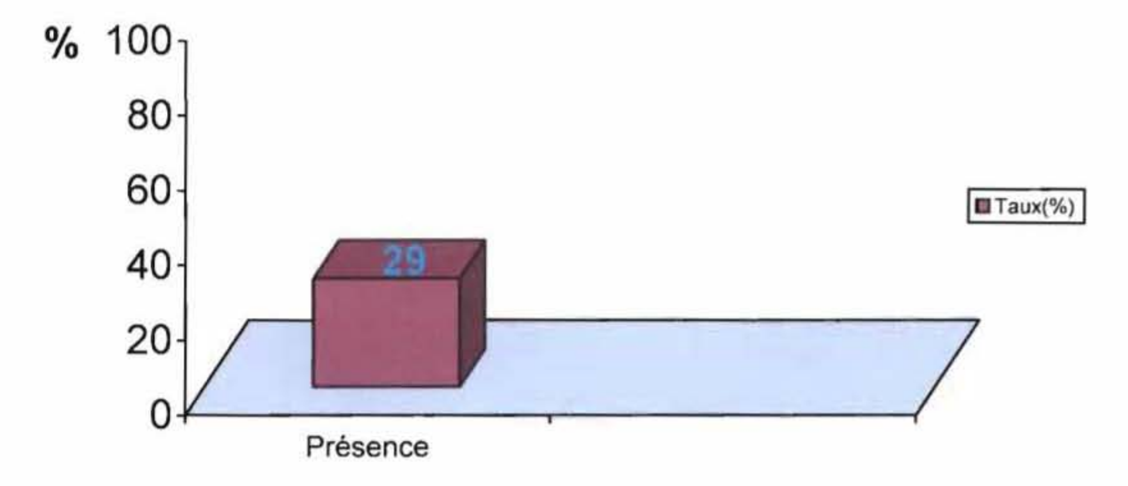


Figure 5 : Le taux de présence des leucocytes.

f. L'antibiogramme.

Ce test des germes aux antibactériens est à but indicatif. La sensibilité aux antibiotiques sur gélose Muëller-Hinton (Bio Merieux) avec des disques donne une forte résistance à l'Augmentin 90 %, 10% au Ceftriaxone ainsi que l'indique la figure 6. Ce test porte sur 10 des souches conservées.

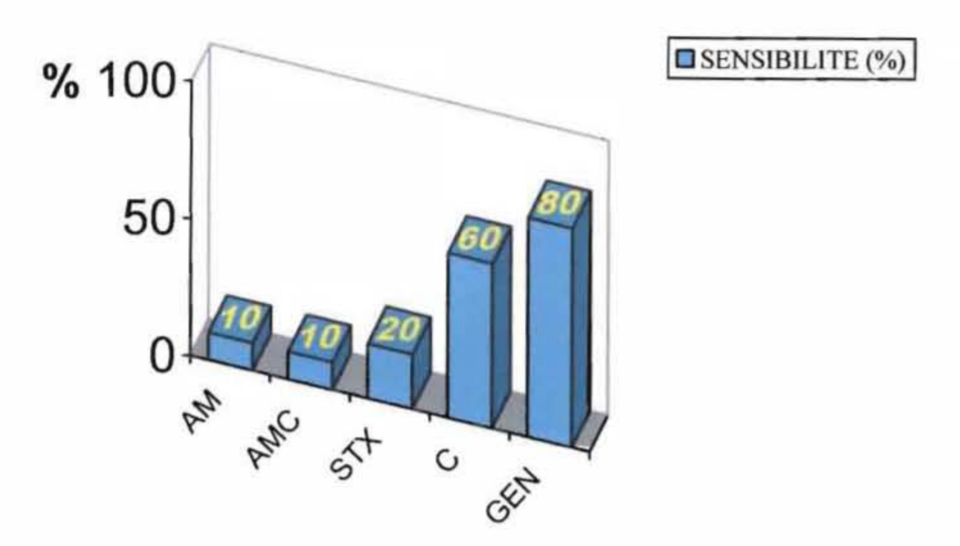


Figure 6 : Sensibilité des Escherichia coli aux antibiotiques
AM : Ampicilline; AMC : Amoxiciline + Acide Clavudique ;
STX : Cotrimoxazole ;
C : Chloramphénicol ; GEN : Gentamicine

IV. Commentaires.

Les bactéries de la famille des *Entérobactéries* que nous avons rencontrées sont essentiellement les *Escherichia coli* et les *Salmonella*. Nous n'avons pas trouvé de *Shigella* ni de Vibrions. En ce qui concerne la séparation des Escherichia coli en pathovars une agglutination aurait été nécessaire.

Nous avons constaté un nombre non négligeable de levures dans les selles, Le test de filamentation réalisé sur plusieurs échantillons à été positif. L'incidence de la candidose 38,5 % tient du fait que Candida est très courant chez les enfants en bas âge chez qui il peut devenir pathogène des suites aux traitements d'antibiothérapie pour d'autres pathologies. Nous savons qu'une antibiothérapie prolongée détruit une partie de la flore commensale de l'intestin permettant ainsi une prolifération des germes opportunistes.

Le nombre de selles contenant les leucocytes 29% oriente sur la part des souches invasives dans notre échantillon. Il devient alors intéressant de procéder à une identification plus poussée de nos souches d'*Escherichia coli* pour situer l'apport des germes Entéroinvasives de notre échantillon.

Pour ce qui concerne la sensibilité des souches collectées aux antibiotiques, les 10 échantillons testés donnent une très forte résistance à l'Augmentin 90%, l'Ampicilline 90%, au Cotrimoxazole 80% ce qui peut s'expliquer par l'utilisation fréquente de ces antibactériens en traitement de première intension. Torres M.E. et ses collaborateurs ont testé des souches d'*Escherichia coli* isolées dans des selles d'enfants atteints de diarrhée (21). Elles étaient résistantes à 96.25% à l'Ampicilline, 43.75% au

Cotrimoxazole, 10.4% au Chloramphénicol, 20 % à la Gentamicine. Estrada-Garcia T. et ses collaborateurs indiquent une résistance de 73% pour l'Ampicilline et 65% pour Cotrimoxazole (9).

V.Conclusion

Les maladies gastriques liées aux infections bactériennes sont des pathologies dont il ne faut pas perdre la portée en santé publique. En effet, la morbidité voire la mortalité qui leur est associée concerne de façon dramatique les jeunes enfants qui sont en pleine croissance physiologique. L'intérêt de se pencher sur ce sujet d'étude réside dans la volonté de comprendre les aspects qui entourent ces maladies dans notre environnement.

Ainsi, l'objectif fixé était d'évaluer l'incidence des *Escherichia coli* pathogènes à tropisme intestinal et plus précisément l'apport des souches invasives. Nous n'avons pu faire le sérotypage des échantillons collectés. Les résultats intermédiaires donnent la présence des *Escherichia coli* à 75%, *Salmonella* à 5.8% et les leucocytes à 29% pour lesquels il serait intéressant de rechercher les germes invasifs. La chimiorésistance croissante des bactéries aux antibiotiques est remarquée à travers les valeurs obtenues pour certains qui sont couramment prescrits.

Le sujet sur les gastro-entérites dans leur ensemble tant chez les enfants que les adultes mérite une ou des études globales à l'échelle du pays qui permettrait de vraiment appréhender leur incidence dans population et dans les formations sanitaires. Et par la suite, tout comme pour d'autres pathologies, mettre en place une surveillance épidémiologique.

Référence bibliographique

1. Amhis W. *et al.* (2001). Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine du Maghreb, N° 91,* p. 22-25
2. Aumaître H. *et al.* (2004). Diarrhées bactériennes. *EMC-Chirurgie, 1,* p. 437-454
3. Belouni R. (2001). Critères de choix d'un antibiotique. *Médecine du Maghreb, N° 91,* p.26-27
4. Benslimani A., Ammari H., Yala D. (2001), Action des antibiotiques in vivo. *Médecine du Maghreb, N° 91,* p.15-16

   Site : www.santetropicale.com/
5. Bhutta Z. A. (2006). Diarrhées persistantes dans les pays en développement. *Ann. Nestlé,* **vol 64**, p.39-48
6. Carré D. (2004). Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë. Etiologies. *EMC-Chirurgie 1*, p. 493-532.

   Site : www.elsevier.com/locate/emcchi
7. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2006) Communiqué de 2006

   Site : http://www.sfm.asso.fr/
8. Diallo S., Camara Y.B. Diarrhée aiguë du nourrisson et état nutritionnel à l'INSE. *Médecine d'Afrique Noire*, 1998, **Vol. 45**, N° 6, p.372-374

   Site : www.santetropicale.com/resume/64503.pdf
9. Estrada-Garcia T. *et al.* (2005) Drug-resistant diarrheogenic Escherichia coli, Mexico. Emerging Infectious Diseases, **Vol. 11, N° 8**, p.1306-1308

   Site web: www.cdc.gov/eid
10. Grenier B. et Andremont A. (1991). Diarrhées aigues infectieuses. In : *Les infections* 3è Ed, chap. 16, p251-273
11. Institut National de la Statistique et de la Démographie et ORC Macro.(2004). Enquête Démographique et de Santé du Burkina Faso 2003. Calverton, Maryland, USA : INSD et ORC Macro

    Site web: http://www.insd.bf/
12. Institut de Veille Sanitaire. (2005). Enquête sur les méthodes de diagnostic des *E. coli* Entéropathogènes et des *E. coli* Entérohémorrhagiques dans les laboratoires d'analyses médicales en France, en 2003

    Site: www.invs.sante.fr/publication/2006/enquete_e_coli_2003/enquete_e_coli.pdf
13. Mainil J. (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'Escherichia coli :I) les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann. Méd. Vét.*, **vol. 147**, p. 105-126
14. Nataro J. N., Kaper J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, **vol 11 N°** 1,p 142-201

15. Okeke I.N. *et al.* (2000), Characterization of Escherichia coli strains from cases of childhood diarrhea in Provincial South western Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology*, **Vol. 38 N° 1**, p.7-12.

16. Pal T.(1985). Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Enteroinvasive Escherichia coli and Virulent Shigella Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 415-418

17. Patrick Yeni. 2003. *Infection de l'appareil digestif.* In : *Pathologie infectieuse* (3è éd.), Flammarion, Chap.5, p76

18. Prudhomme Ch., J-F. d'Ivernois. (2003). Diarrhées du nourrisson. In : *Connaître et comprendre 1000 maladies de A à Z.* Ed. Vigot, p111.

19. Sall M. G. (1999). Etude comparative de la SRO seule et de l'association eau de riz + Al 110. *Médecine d'Afrique Noire,* vol 46 N° 10, p486-487

20. Sanou I. *et al.* (1999). Diarrhée aiguë de l'enfant : aspects épidémiologiques, cliniques et évolutifs en milieu hospitalier pédiatrique à Ouagadougou. *Médecine d'Afrique Noire,* **Vol 46,** N° 1, p21-26

    Site web: www.santetropicale.com/resume/14604.pdf

21. Torres M.E. *et al.*(June 2001).Etiology of children's diarrhea in Mondivideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *Journal of Clinical Microbiology,* **Vol.39**, N°6, p2134-2139

22. Van der Geer E. R. et Prats J. (1992). La connaissance et l'utilisation de la réhydratation orale. *Médecine d'Afrique Noire*, **Vol.39**, N° 4, p261-267

    Site web: www.santetropicale.com/resume/43902.pdf

23. Vidal M. et al. (Oct. 2005). Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic Escherichia coli associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **Vol. 43**, N°10, p5362-5365

24. UNICEF. (2004). Prise en charge clinique de la diarrhée aiguë.

    Site: http://www.eddcontrol.org/files/Clinical_Mgmt_Acute_Diarrhoea_Fr_WHO_UNICEF.pdf